Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN INFLUENZAVIREN UND THROMBOCYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marianne Scriba
aus Alsfeld

1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535704_0023

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin.
Direktor: Professor Dr.med. Bernhard Schmidt.

WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN INFLUENZAVIREN UND THROMBOCYTEN.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marianne Scriba
aus Alsfeld

Dekan: Prof.Dr.med.Wilhelm Maßhoff

Referent: Prof.Dr.med.Bernhard Schmidt

Korreferent: Prof.Dr.med.Fritz Trautmann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 15.2.1966

G L I E D E R U N G

		Seite
A	EINLEITUNG und FRAGESTELLUNG	1
B	THEMA: Wechselwirkungen zwischen Influenzaviren und Thrombocyten	
	I. Material und Methoden	6
	II. Ergebnisse	10
	1.) Das Phänomen der in vitro-Aggregation von Thrombocyten durch Influenzaviren	10
	2.) Virusadsorptions- und -elutionsstudien an Schafthrombocyten	13
	a) Quantitative Virusadsorptions- und -elutionsstudien an Thrombocyten	13
	b) Die Anlagerung von Influenzaviren an vorbehandelte Thrombocyten (gleichzeitig die Frage nach dem virusgerichteten Rezeptor der Thrombocyten)	25
C	DISKUSSION	30
D	ZUSAMMENFASSUNG	36
E	LITERATURNACHWEIS	37

A EINLEITUNG

Im Jahre 1941 haben Hirst (28), sowie gleichzeitig und unabhängig von ihm Mc Clelland und Hare (53) erstmals über die Fähigkeit von Influenzaviren berichtet, rote Blutkörperchen zu agglutinieren. Seitdem ist eine Vielzahl von Arbeiten über die Wechselwirkungen zwischen Viren und Erythrocyten erschienen. Die enzymatisch aktiven Influenzaviren, die zur Gruppe der Myxoviren gehören, lagern sich unter anderem an Hühnererythrocyten an und bauen einen virusgerichteten Rezeptor an deren Oberfläche ab. Dieses rezeptorzerstörende Enzym (receptor destroying enzyme: "RDE") ist ein integrierender Bestandteil des kompletten infektiösen Viruspartikels. Es handelt sich um eine Neuraminidase, die z.B.auch im Filtrat von Vibrio cholerae (12, 77), Clostridium welchii (54) und einiger Pneumokokkenstämme (14) nachgewiesen wurde. Die neuraminsäurehaltigen Substrate des Enzyms finden sich nicht nur an der Oberfläche von Blutkörperchen, sondern auch an der Oberfläche vieler Organzellen und in "gelöster Form" z.B. in Normalseren (7).

Die an die Erythrocyten adsorbierten Viruspartikel können in der Wärme zum großen Teil wieder eluiert werden, ein Phänomen, das man sich bei der Reinigung der Influenzaviren zunutze macht. Die Liberierung der Viruspartikel geht mit einer Desaggregation der Erythrocyten einher. Die virusvorbehandelten Erythrocyten gewinnen drei neue Eigenschaften: sie können vom homologen Virus nicht noch einmal agglutiniert werden, sie sind panagglutinabel, d.h. sie lassen sich durch menschliche und tierische Normalseren agglutinieren (12), und sie reagieren mit inkompletten Rhesusantikörpern (63, 77).

Das eluierte Virus geht unverändert aus der Wechselwirkung mit den Erythrocyten hervor.

Die mit einem Influenzavirusstamm enzymatisch vorbehandelten Erythrocyten können jedoch von verwandten Influenzavirusstämmen wieder agglutiniert werden, wenn diese eine größere Fermentaktivität besitzen. Auf Grund des unterschiedlichen Grades des Rezeptorabbaues sind die Influenzaviren und andere Myxoviren in einer Reihe, dem sog.Rezeptorgradienten, zusammengestellt worden (12).

Auch die Wechselwirkungen zwischen Viren und Leukocyten sind bereits näher studiert worden.
Aehnlich wie bakterielle Erreger werden auch Viren in vitro und in vivo von Leukocyten phagocytiert (4, 6, 16, 22, 23, 26, 35, 37, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 52, 58, 60, 62). Innerhalb der Leukocyten verhalten sich die Viren sehr unterschiedlich; es sind sowohl Viren bekannt, die intraleukocytär rasch absterben (16, 24), als auch solche, die längere Zeit überleben (45, 48) oder sich sogar in ihrem neuen Wirt vermehren (4, 22, 26, 48). Als Folge der Virusinfektion von Leukocyten kann es zu einer Reduktion der Phagocytosefähigkeit gegenüber bakteriellen Erregern kommen (21, 43, 44, 57).

Die Frage nach dem virusgerichteten Rezeptor der Leukocyten ist von Ginsberg und Blackmon (24) bearbeitet worden. Anhand von Adsorptions- und Elutionsversuchen mit Influenzaviren (Stämme A/PR8 und B Lee) unter Verwendung von Meerschweinchenleukocyten konnten die Autoren allerdings keine bindenden Aussagen darüber machen, ob die Leukocyten virusgerichtete Rezeptoren besitzen, die mit denjenigen an der Erythrocytenoberfläche identisch sind.
Nach der Einwirkung von Influenzaviren auf Leukocyten ist es in vitro und in vivo zu Aggregationserscheinungen der weißen Blutkörperchen gekommen (27, 61), ein Phänomen, das rein äußerlich der Erythrocytenaggregation gleicht. Ob eine Desaggregierung der verklumpten Leukocyten erfolgt, ist aus den mitgeteilten Befunden nicht ersichtlich. Neben der

Phagocytoseaktivität und der virusbedingten Agglutination der weißen Blutkörperchen kommt es unter dem Einfluß der Viren vermutlich auch zur Lysis dieser Zellen. Entsprechende Versuche in vitro liegen unseres Wissens jedoch nicht vor.

Ueber die Einwirkung von Viren auf die dritte Blutzellart, nämlich die Thrombocyten, ist bisher wenig bekannt geworden. Thrombocyten haben die Fähigkeit, eine Vielzahl der Plasmabestandteile an ihre Oberfläche zu adsorbieren (1), so daß man geradezu von einer "atmosphère plasmatique" sprach (68), mit der sich die Plättchen umgeben. Sie sind nicht nur in der Lage, Plasmaproteine (z.B.nahezu alle Gerinnungsfaktoren), biogene Amine (u.a.Serotonin [8, 10, 36], Adrenalin und Nor-Adrenalin [9, 80]) und weitere Stoffe zu adsorbieren, sondern sie vermögen darüber hinaus auch Fremdbestandteile, z.B.Tusche, zu binden (70). Bakterienendotoxin kann in vitro und in vivo an der Thrombocytenoberfläche haften und die Plättchen zur Aggregation bringen (17, 65). Die Folge davon ist, daß gefäßaktive Stoffe (Serotonin, Histamin) und Gerinnungsfaktoren freigesetzt werden (18, 31, 42, 64, 65, 74). In vivo zeigt sich die Schädigung der Thrombocyten an ihrer zahlenmäßigen Verminderung nach intravenöser Endotoxingabe (56, 73, 76). Auch komplette Bakterien lassen sich in vitro und in vivo gut an die Plättchenoberfläche anlagern; ein Vorgang, der ebenfalls von einer Plättchenaggregation und -fusion gefolgt ist (2, 11, 19, 25, 32, 33, 34, 67).

Die Frage, wieweit Thrombocyten fähig sind, auch Viruspartikel zu binden, ist erst in den letzten Jahren eingehender bearbeitet worden.
Allerdings hat bereits im Jahre 1929 Smith (75) auf eine mögliche Beteiligung der Thrombocyten am Virämiegeschehen hingewiesen. Der Autor beobachtete bei Ratten, denen er intradermal bzw. intravenös Vacciniaviren appliziert hatte, während der Virämiephase in den Leukocyten die größte Infektiosität. Aber auch in der Zellfraktion, die vornehmlich

Thrombocyten enthielt, waren Viren nachweisbar, wenn auch nur in geringen Mengen. Da die verwendeten Thrombocytenpräparationen nicht gänzlich frei von Leukocyten waren, besitzt allerdings die Aussage über das Virusbindungsvermögen der Thrombocyten in vivo nur eine geringe Beweiskraft. Es handelt sich unseres Wissens hierbei um den einzigen Versuch, der einen Hinweis auf die mögliche Anlagerung von Viruspartikeln an Thrombocyten in vivo gibt.
In vitro hat als erster Motulsky (59) eine Aggregation von Menschen- und Rattenthrombocyten, hervorgerufen durch Influenzaviren (Stämme A/PR8, A_1/FM_1 und Lee), beschrieben. Gewaschene Blutplättchen wurden 15 Stunden bei 4°C mit Influenzaviren inkubiert; die Aggregation der Thrombocyten wurde makroskopisch und mikroskopisch verfolgt. Das Aggregationsphänomen ließ sich durch spezifische Antiseren hemmen.
1958 wurden die genannten Ergebnisse von Lu (50) bestätigt. Der Autor, der mit Influenza- und Mumpsviren arbeitete, wies die Viruspartikel darüber hinaus auch mittels fluoreszeinmarkierter Antiseren an der Thrombocytenoberfläche nach.

Jerushalmy und Mitarb. (39) erzielten eine Mischaggregation menschlicher Thrombocyten und Erythrocyten durch Inkubation der Zellsuspensionen mit Influenzaviren vom Stamm A_1/FM_1. In diesen Mischaggregaten konnten die Influenzaviren elektronenoptisch als Brücke zwischen Erythrocyten und Thrombocyten nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß die virusgerichteten Rezeptoren der beiden Zellarten identisch sind.
Die gleiche Forschergruppe wies auch i n n e r h a l b menschlicher Thrombocyten elektronenoptisch Influenzaviren nach (15). Die Viruspartikel befänden sich meist in Vakuolen nahe der Plättchenoberfläche. Auch hitzeinaktiviertes Virusmaterial wurde innerhalb der Thrombocyten gefunden.
Genauere Untersuchungen über die Kinetik der Virusadsorption und -elution stellte diese Forschergruppe in der Folgezeit an (40). Die Autoren fanden bei der Adsorption von Influenzaviren (Stamm A_1/FM_1) und Newcastle Disease Viren an

gewaschene menschliche Thrombocyten eine ähnliche Zeit- und Temperaturabhängigkeit wie bei der Adsorption an Erythrocyten. Dabei ergaben sich jedoch, verglichen mit den Verhältnissen bei Erythrocyten, bestimmte Besonderheiten:
Einmal zeigte sich die Adsorption unabhängig von der Kationenkonzentration, und zum anderen wurden auch nach Behandlung der Thrombocyten mit RDE noch geringe Virusmengen an die Zellen adsorbiert. Zudem ergab sich bei dem Versuch, das adsorbierte Virusmaterial bei 37°C wieder zu eluieren, eine nur langsame und inkomplette Elution der Viren von der Thrombocytenoberfläche. Nach siebenstündiger Elution waren etwa 50% der adsorbierten Viruspartikel eluiert. Auch hier nehmen die Autoren an, daß der Rezeptor an der Thrombocytenoberfläche mit dem an der Erythrocytenoberfläche identisch ist.
Ein nach der Adsorption in die Thrombocyten gelangtes Virus kann diesen Untersuchungen zufolge nicht mehr freigesetzt werden.

In der nachstehenden Arbeit sollen bestimmte Wechselwirkungen zwischen Influenzaviren und Thrombocyten untersucht werden. Dabei sollen das Phänomen der in vitro-Aggregation von Thrombocyten sowie das quantitative Adsorptions- und Elutionsgeschehen und der enzymatische Abbau virusgerichteter Rezeptoren der Thrombocyten Berücksichtigung finden. Die Versuche sollten weitere Hinweise auf die chemische Zusammensetzung solcher Rezeptoren ergeben.

B I. MATERIAL und METHODEN

1.) Gewinnung der Thrombocyten:

a) Silikonisieren der Glasgeräte und Kanülen:
Zur Blutentnahme und zu allen übrigen Arbeitsverrichtungen mit Thrombocyten wurden stets silikonisierte Geräte verwendet. Die mit Bichromat-Schwefelsäure entfetteten Glasgeräte und Kanülen wurden mit einer 2 g%igen Lösung von Silikonöl (Silicone DC 200, Wacker-Chemie, München) in Tetrachlorkohlenstoff gründlich gespült. Das Silikon wurde anschließend 6 Stunden bei 200°C eingebrannt.

b) Methodik der Gerinnungsverhütung:
Als Antikoagulans wurde das Dinatriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet. Menschliches Blut wurde nach den Angaben von Fischer und Landbeck (20) im Verhältnis 1:10 mit folgender Lösung versetzt:
70 ml isotonische Kochsalzlösung, 2 ml Tween 80, 24 ml 25%ige Polyvinylpyrrolidon-Lösung (mittleres Mol.-Gew. 30 000) +, 5 g EDTA.
Wegen der hämolysierenden Wirkung dieser Lösung auf Erythrocyten von Schaf und Kaninchen wurde diesen Blutproben 5%iges EDTA in 0,7%iger Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 zugesetzt.
Das Blut wurde bei der Entnahme direkt aus der Kanüle in den mit Antikoagulans beschickten Zentrifugengläsern aufgefangen.

+ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Firma Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

c) Isolierung der Thrombocyten:

M e n s c h l i c h e T h r o m b o c y t e n :
Nach der Entnahme aus der Cubitalvene wurde das Blut zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, das thrombocytenreiche Plasma vorsichtig abpipettiert und zur Entfernung der restlichen Erythrocyten 10 min bei 140 g zentrifugiert. Der Ueberstand wurde nochmals 15 min bei 570 g zentrifugiert und das Thrombocytensediment in wenig Plasma resuspendiert.

K a n i n c h e n - T h r o m b o c y t e n :
Sofort nach Entnahme (aus der Ohrvene oder durch Herzpunktion) wurde das Blut 20 min bei 120 g zentrifugiert und das überstehende thrombocytenreiche Plasma durch nochmaliges 20 Minuten langes Zentrifugieren bei 120 g von weiteren Erythrocyten befreit. Danach wurden aus dem Ueberstand durch Zentrifugation bei 1800 g (20 min) die Thrombocyten zur Sedimentation gebracht. Das Sediment wurde in Plasma resuspendiert.

S c h a f - T h r o m b o c y t e n :
Aus der V.jugularis entnommenes Blut wurde 40 min bei 170 g zentrifugiert. Die obere, weitgehend erythrocytenfreie, thrombocytenhaltige Plasmaschicht wurde zunächst abgenommen. Um eine möglichst große Thrombocytenausbeute zu erreichen, wurde auch die untere Plasmaschicht zusammen mit der oberen Sedimentschicht in ein weiteres Zentrifugenglas überführt und 30 min bei 240 g zentrifugiert. Der daraus resultierende Plasmaüberstand wurde danach mit dem bereits gewonnenen und beschriebenen oberen Plasmaanteil 30 min bei 1 480 g zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal in phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung, pH 7,4 (im folgenden als "Puffer" bezeichnet), gewaschen und anschließend in Puffer resuspendiert. Nachdem der Ansatz 1 bis 2 Stunden bei

Zimmertemperatur unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln belassen wurde, lag eine homogene Thrombocytensuspension vor, die makroskopisch keine und mikroskopisch nur vereinzelte Thrombocytenaggregate enthielt. Die Erythrocytenbeimengung war nicht größer als 0,1%.

2.) Virusmaterial

Verwendet wurden Influenzaviren der Stämme A_2/Sing/1/57 und B Lee.

a) Gewinnung des virushaltigen Ausgangsmaterials:
Alle Versuche wurden mit virusinfizierten Allantoisflüssigkeiten ("VA") embryonierter Hühnereier durchgeführt. Die Eier wurden 9 Tage bei 37°C vorbebrütet, mit 10^2 ID_{50}-Einheiten beimpft und die VA nach 48stündiger Bebrütung bei 35,5°C geerntet. Die Allantoisflüssigkeiten wurden bei 1 000 g 20 min zentrifugiert, um Gewebepartikel und Schwebeteilchen zu entfernen. Die beiden Stämme waren durch zahlreiche Eipassagen gegangen, der A-Stamm lag in der D-Phase vor.
Frisch geerntete Allantoisflüssigkeit des Stammes B Lee wurde 30 min auf 56°C erhitzt und als Indikatorvirus verwendet.

b) Auswertung des virushaltigen Materials:
Bestimmung der ID_{50}: Je eine Gruppe von 6 neuntägig vorbebrüteten Eiern wurde mit fallenden Mengen einer VA beimpft und 48 Stunden nachbebrütet. Diejenige Virusdosis, die imstande war, 50% der Eier zu infizieren, wurde nach der Methode von Reed und Muench bestimmt (66). Die ID_{50} lag bei dem Stamm A_2/Sing/1/57 bei $10^{-9,5}$ und bei dem Stamm B Lee bei $10^{-6,2}$.

Bestimmung des Hämagglutinationstiters ("HT"):
Die Titerbestimmung erfolgte in Anlehnung an die von Salk (69) angegebene Methode. Von dem virushaltigen

Material wurden Verdünnungsreihen mit dem Faktor 2 in Puffer hergestellt und je 0,5 ml der Virusverdünnung auf Salk-Plexiplatten mit 0,5 ml einer 0,75%igen Hühnererythrocytensuspension versetzt. Die Platten wurden zwei Stunden bei 4°C aufbewahrt und danach die Titer abgelesen. Sie werden im folgenden als reziproke Werte der höchsten Virusverdünnungsstufen angegeben, die noch eine komplette Agglutination hervorrufen.

3.) Vorbehandlung der Thrombocyten durch VA, RDE, Trypsin, Perjodat und Ultraschall:

Die genauen Vorschriften sihe unter II 2b.
Hier sollen lediglich Präparate bzw.das verwendete Ultraschallgerät aufgeführt werden.
Receptor destroying enzyme (RDE): Präparat der Behringwerke AG, Marburg/Lahn.
Trypsin: Präparat der Firma Th.Schuchardt, München, mit einer Aktivität von 15.000 BAEE-Einheiten pro mg Protein.
$NaJO_4$: Natrium-meta-Perjodat der Firma E.Merck AG, Darmstadt.
Ultraschallgerät: Sonorex HE 1 der Firma Bandelin, Berlin (Frequenz 25 kHz, Spitzenleistungsdichte ca 100 Watt/cm^2).

4.) Ultrazentrifugation:

Die Zelltrümmer der durch Ultraschall zerstörten Thrombocyten wurden durch 10minutenlanges Zentrifugieren bei 15.000 Umdrehungen/min, entsprechend 18.000 g in der Röhrchenmitte, zur Sedimentation gebracht.
Verwendete Ultrazentrifuge: Universal-Rapid der Firma Christ, Osterode.

5.) Mikroskopische Untersuchungen:

Die Morphologie der Thrombocyten wurde im Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Opton) studiert. Die Thrombocytenzählungen erfolgten in einer Zählkammer nach Neubauer im Phasenkontrastmikroskop. Die Aufnahmen der Thrombocyten wurden mit der Leica auf Agfa-Filmmaterial (Agfa Isopan IF 17/10 Din) gemacht.

B II. ERGEBNISSE

1.) Das Phänomen der in vitro-Aggregation von Thrombocyten durch Influenzaviren.

Zunächst wurde geprüft, ob sich eine Aggregation der Thrombocyten vom Menschen, Kaninchen und Schaf durch Influenzaviren erzielen läßt.
Dazu wurden menschliche Thrombocyten in autologem Plasma suspendiert und zu je 0,5 ml dieses thrombocytenreichen Plasmas 0,5 ml der VA (Virusstamm: A_2/Sing/1/57) in fallender Konzentration zugesetzt. Die Ansätze wurden bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Es ergab sich eine makroskopisch ablesbare Thrombocytenaggregation bis zu einer Verdünnung der VA von 1:120 (HT des Virusausgangsmaterials: 4.000). Die Kontrollen mit normaler Allantoisflüssigkeit (NAF) führten nicht zu einer Aggregation der Thrombocyten. Aehnlich wie beim negativen Ausfall des Virushämagglutinationstestes, setzten sich die Thrombocyten ohne ausreichende Mengen von Virusmaterial knopfförmig am Boden des Röhrchens ab. Im Falle einer virusinduzierten Aggregation bildete sich ein deutlich sichtbarer Film am Röhrchenboden aus. Dieses Resultat stimmt mit den Befunden von Motulsky (59) und Lu (50)

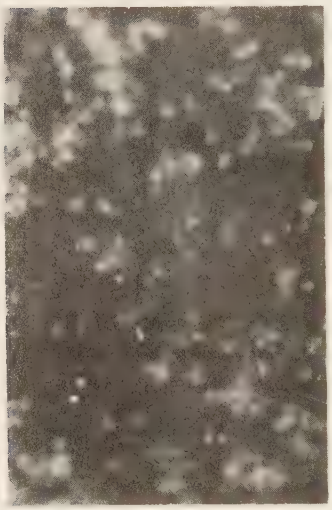
überein, die allerdings mit den Influenzavirusstämmen A/PR8, A_1/FM_1 und B Lee gearbeitet haben.

Auch die Thrombocyten von Kaninchen und Schaf konnten durch VA aggregiert werden. Mit Kaninchenthrombocyten, die ebenfalls in autologem Plasma suspendiert vorlagen, ergab sich bei gleichem Virusgehalt, verglichen mit menschlichen Thrombocyten, nur ein geringer Thrombocyten-Aggregationstiter (1:8).

Mit Thrombocyten vom Schaf wurde eine Objektträgeraggregation ausgeführt: Ein Tropfen einer Thrombocytensuspension wurde mit einem Tropfen einer infizierten Allantoisflüssigkeit (A_2/Sing/1/57 und B Lee) bzw. mit einem Tropfen NAF auf einem silikonisierten Objektträger gemischt und in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 1-2 Stunden ließ sich eine deutliche, makroskopisch sichtbare Aggregation der Thrombocyten durch die virusinfizierte Allantoisflüssigkeit nachweisen, während in den Kontrollen (NAF) die Thrombocyten homogen suspendiert blieben.

Die aggregierten und nicht aggregierten Thrombocyten wurden im Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskop dargestellt. Die Abbildungen 1a-d zeigen Aufnahmen von Schafthrombocyten, die mit NAF und in einem weiteren Versuchsansatz mit VA inkubiert worden waren. Dazu ist allerdings zu bemerken, daß sich auch in den mit NAF gemischten Thrombocytensuspensionen regelmäßig einige mikroskopisch nachweisbare Thrombocytenaggregate fanden. Andererseits haben wir zwischen den virusinduzierten Thrombocytenaggregaten stets zahlreiche nicht aggregierte Blutplättchen gefunden. Eine mikroskopische Beurteilung von positiven und negativen Reaktionsausfällen ist daher nur nach eingehender Durchmusterung der Präparate möglich. Auffällig ist, daß innerhalb der Beobachtungszeit von 12 Stunden die virusinduzierte Aggregation der Thrombocyten nicht von Desintegration und Fusion der Blutplättchen gefolgt war.

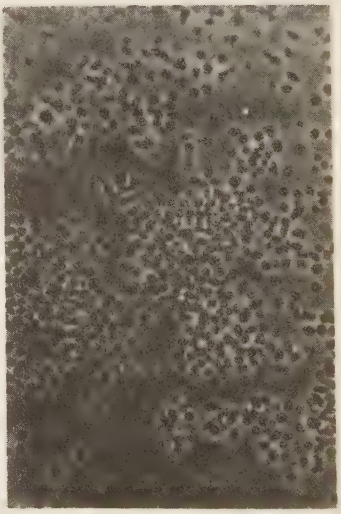
Abbildung 1: Durch Influenzaviren hervorgerufene Thrombocytenaggregation.



a

b

c



d

Erläuterung: Dunkelfeld- (a und b) und phasenkontrast-mikroskopische (c und d) Abbildungen.

a und c: Schafthrombocytensuspension unter Zusatz von NAF (Kontrolle)

b und d: Schafthrombocytensuspension unter Zusatz von VA.

2.) Virusadsorptions- und -elutionsstudien an Schafthrombocyten.

a) Quantitative Virusadsorptions- und-elutionsstudien an Thrombocyten:

Je 0,5 ml der VA (Virusstamm: A_2/Sing/1/57) in fallenden Konzentrationen wurden mit gleichen Volumina einer Thrombocytensuspension versetzt. Die Adsorption der Viren an die Blutplättchen erfolgte 60 min bei 4°C. Danach wurde das Sediment in der Kälte abzentrifugiert (5 min bei 1.480 g), einmal mit 5 ml eiskaltem Puffer gewaschen, danach wieder in 1 ml Puffer suspendiert und zur Elution in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Die Dauer der Elution lag zunächst bei 1-2 Stunden, danach wurde das Sediment abzentrifugiert. In einem Teil der Versuche wurde das Plättchensediment in 1 ml Puffer resuspendiert und zur weiteren Elution bei 37°C belassen. Anschließend wurde der HT der jeweiligen Ueberstände bestimmt. Typische Ergebnisse dieser Adsorptions-Elutions-Versuche mit den beiden genannten Virusstämmen sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt worden. Tabelle 3 gibt die Resultate eines Adsorptions-Elutions-Versuches wieder, bei dem Thrombocytensuspensionen unterschiedlicher Konzentration mit gleichbleibenden Virusmengen zur Reaktion gebracht worden waren. Die Tabelle 4 zeigt zum Vergleich das Adsorptionsgeschehen an Hühnererythrocyten.

Tabelle 1: Adsorption von nicht erhitzten und erhitzten Influenzaviren an Thrombocyten (Versuch 1).

Influenzavirusstamm	Verdünnung der VA	HT der Virus-Thrombocyten-Mischung (errechnet)	HT der Ueberstände nach: Adsorption (60'- 4°C)	Waschen des Sedimentes	1.Elution (60'- 37°C)	2.Elution (weitere 14 h - 37°C)
B Lee (nicht erhitzt, HT=2048)	1:2	1024	128	8	128	64
	1:4	512	64	-	128	8
	1:8	256	32	-	32	
	1:16	128	16	-	8	8
B Lee (erhitzt, HT=2048)	1:2	1024	64	-	64	16
	1:4	512	32	-	16	8
	1:8	256	16	-	4	4
	1:16	128	8	-	4	4
A_2/Sing/1/57 (nicht erhitzt, HT= 512)	1:2	256	4			

Erläuterung: Thrombocytenzahl : 1,6 x 10^6/cmm. Die VA wurde in geometrischer Reihe mit dem Faktor 2 titriert, gleiche Volumina des Thrombocytenansatzes wurden zugegeben und der Virushämagglutiningehalt der Ueberstände nach verschiedenen Arbeitsgängen bestimmt. (Näheres s.Text.)

Tabelle 2: Adsorption von Influenzaviren (Stamm: A_2/Sing/1/57) an Thrombocyten (Versuch 2).

Verdünnung der VA	HT der Virus-Thrombocyten-Mischung (errechnet)	HT der Ueberstände nach: Adsorption (60'- 4°C)	Waschen des Sedimentes	Elution (2 h - 37°C)
1:2	512	4	-	128
1:4	256	-	-	64
1:8	128	-	-	16
1:16	64	-	-	4

Erläuterung: Thrombocytenzahl: 2,9 x 10^6/cmm. Die VA (HT=1024) wurde in geometrischer Reihe mit dem Faktor 2 titriert, gleiche Volumina der Thrombocytensuspension wurden zugesetzt und nach verschiedenen Arbeitsgängen die HT der Ueberstände bestimmt.

Tabelle 3: Der Einfluß der Thrombocytenzahl auf die Adsorptions- und Elutionsrate von nicht erhitzten und erhitzten Influenzaviren des Stammes B Lee.

Virusmaterial	Thrombocytenzahl pro cmm	HT der Virus-Thrombocyten-Mischung (errechnet)	HT der Ueberstände nach: Adsorption (50'-4°C)	1.Elution (2h-37°C)	2.Elution (weitere 15h-37°C)
nicht erhitzte Virussuspension	1,3 x 10^6	512	64	64	16
	7,7 x 10^6	512	16	32	32
erhitzte Virussuspension	1,3 x 10^6	512	128	64	16
	7,7 x 10^6	512	16	4	-

Erläuterung: Thrombocytensuspensionen unterschiedlicher Konzentration wurden mit gleichen Volumina Virussuspension (HT=1024) inkubiert. Nach der Adsorption, sowie nach 2stündiger und 15stündiger Elution wurde der Virushämagglutiningenalt der Ueberstände bestimmt.

Tabelle 4: Adsorption von Influenzaviren (Stamm A_2/Sing/1/57) an Hühnererythrocyten.

Verdünnung der VA	HT der Virus-Erythrocyten-Mischung (errechnet)	HT des Ueberstandes nach Adsorption (30'- 4°C)
1:2	512	64
1:4	256	32
1:8	128	16
1:16	64	4
1:32	32	-

Erläuterung: Erythrocytenzahl: 11.500/cmm. Die VA (HT=1024) wurde in geometrischer Reihe mit dem Faktor 2 titriert, gleiche Volumina des Erythrocytenansatzes wurden zugegeben und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei +4°C der Virushämagglutiningehalt bestimmt.

Aus diesen Versuchen geht folgendes hervor:

1) Beide geprüften Virusstämme wurden an die Thrombocytenoberfläche adsorbiert, wobei die Bindungskapazität für den A_2-Stamm größer war als für den B-Stamm.

2) Erwartungsgemäß lagerten sich trotz ausreichender adsorbierender Oberfläche nicht alle Viren an die Thrombocyten an. Dieses Verhalten erinnert an die Verhältnisse, wie sie zwischen Myxoviren und Erythrocyten beschrieben wurden (vgl.auch Tabelle 4). Dort stellt sich ein Gleichgewicht ein, wobei abhängig von der angebotenen Virusmenge und von der Erythrocytenzahl ein gewisser Prozentsatz der Viruspartikel frei vorliegt.

3) Bei 37°C eluierte ein Teil der adsorbierten Viruspartikel von der Thrombocytenoberfläche. Die Reaktion verlief jedoch unvollständig und bedeutend langsamer als von der

Erythrocytenoberfläche. Auch nach 15stündiger Inkubation der virusbeladenen Thrombocyten konnten nicht mehr als 30% des adsorbierten Virusmaterials im Eluat nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Jerushalmy und Mitarb. (40) überein, die nach 7stündiger Inkubation virusbeladener menschlicher Thrombocyten gleichfalls nur geringe Virusmengen von den Blutplättchen absprengen konnten. Die Versuchsergebnisse lassen den Schluß zu, daß der größere Teil der Viren fest an die Thrombocyten gebunden vorliegt. Allerdings ist bei der Bewertung dieser Befunde zu berücksichtigen, daß wir die Influenzaviren in ein geringes Flüssigkeitsvolumen eluierten. Es ist zu vermuten, daß die Viruselutionsrate ansteigt, wenn die Elution in eine größere Flüssigkeitsmenge erfolgt.

4) Die Elutionsrate war bei konstantem Flüssigkeitsvolumen abhängig von der adsorbierten Virusmenge und von der Thrombocytenzahl.

5) Im Gegensatz zum Viruselutionsgeschehen unter Verwendung von Erythrocyten kam es auch zur Freisetzung der Indikatorviren (Stamm B Lee). Dieser Befund läßt vermuten, daß die Virus-Adsorptions-Elutions-Vorgänge an Thrombocyten nicht nur enzymatischer Natur sind.

Da nur ein geringer Anteil des adsorbierten Virusmaterials von den Thrombocyten eluierte, wurde im folgenden versucht, durch Zerstörung der virusbeladenen Thrombocyten zellfixierte Viruspartikel wiederzugewinnen. Hierzu wurden 1 ml VA (Virusstamm: A_2/Sing./1/57) mit 2 ml einer Thrombocytensuspension 30 min bei 4°C inkubiert und danach der HT des Ueberstandes bestimmt. Das Sediment wurde in 5 ml Puffer gewaschen, in 3 ml Puffer aufgeschwemmt und 8 Minuten ultrabeschallt.

Die virushaltigen Zelltrümmer wurden einmal mit RDE (gefriergetrockneter Inhalt einer Ampulle) versetzt und zur Kontrolle unverändert belassen. Beide Proben wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert, danach eine Stunde bei 56°C inaktiviert und anschließend der Hämagglutiningehalt beider Proben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Die quantitative Elution der Influenzaviren des Stammes A2/Sing/1/57 von ultrabeschallten Thrombocyten.

HT der Virus-Thrombocyten-Mischung (errechnet)	HT der Ueberstände nach Adsorption	HT der Ueberstände nach Waschen des Sedimentes	HT nach Beschallen und folgender Inkubation der Zelltrümmer mit RDE	HT nach Beschallen und folgender Inkubation der Zelltrümmer ohne RDE
512	32	8	512	512

Erläuterung: VA (HT=1024) wurde mit intakten Thrombocyten gemischt; die virusbeladenen Thrombocyten wurden anschließend ultrabeschallt, und nach Inkubation mit und ohne RDE wurde der Gehalt an freigesetztem Virushämagglutinin bestimmt. (Näheres s.Text.)

Die Ergebnisse der Tabelle 5 machen deutlich, daß die adsorbierten Viren aus ultrabeschallten Thrombocyten quantitativ freigesetzt wurden. Dabei konnte ein begünstigender RDE-Effekt nicht nachgewiesen werden.

In einem anderen Versuch wurden native und hitzeinaktivierte VA (Stamm B Lee) an Thrombocyten adsorbiert. Die virusbeladenen Blutplättchen wurden im 3fachen Volumen Puffer gewaschen und anschließend ultrabeschallt. Der Virushämagglutiningehalt der Zelltrümmer wurde sofort

nach Beschallen und nach 2stündiger Inkubation bei 37°C bestimmt. Ergebnisse s.Tabelle 6.

Tabelle 6: Die quantitative Elution der nicht erhitzten und erhitzten Influenzaviren des Stammes B Lee von ultrabeschallten Thrombocyten.

Virus-material	HT der Virus-Thrombocyten-Mischung (errechnet)	HT der Ueberstände nach		HT nach Ultraschallbehandlung	
		Adsorption	Waschen des Sedimentes	unmittelbar nach Beschallen	nach Inkubation der Zelltrümmer (2h-37°C)
nicht erhitzte Virussuspension (HT=512)	128	16	-	16	64
erhitzte Virussuspension (HT=512)	128	32	-	32	64

Erläuterung: Es wurden Viren des Influenzavirusstammes B Lee an intakte Thrombocyten adsorbiert, die virusbeladenen Thrombocyten danach ultrabeschallt und der Gehalt an freiem Virushämagglutinin sofort nach Beschallen und nach 2stündiger Inkubationszeit bestimmt.

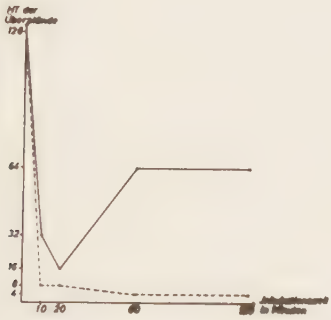
Aus dieser Tabelle geht hervor, daß sofort nach Beschallen des Sedimentes nur ein kleiner Anteil des adsorbierten Virusmaterials nachweisbar war, während nach 2stündiger Inkubation des Ansatzes die Viruspartikel quantitativ von den Zelltrümmern liberiert wurden. Auch bei diesem Versuch zeigte es sich, daß die Indikatorviren ebenfalls eluierten, was wir wiederum als einen Hinweis auf nichtenzymatische Elutionsvorgänge auffassen.

Im folgenden sollen unsere Ergebnisse über die Abhängigkeit der Virusadsorption und -elution von der Zeit und der Temperatur mitgeteilt werden:
Gleiche Teile einer Thrombocyten-Suspension wurden jeweils mit gleichen Volumina einer VA (Stämme A_2/Sing/1/57 und B Lee) bei 10°C und bei 37°C unterschiedlich lange Zeiten inkubiert, danach die virusbeladenen Thrombocyten in der Kälte abzentrifugiert und die HT der Ueberstände bestimmt. Die Ergebnisse wurden in den Abbildungen 2 - 4 zusammengestellt. Die Abbildung 5 zeigt zum Vergleich den Verlauf der Adsorption von Influenzaviren des A_2-Stammes an Hühnererythrocyten.

Aus den Abbildungen 2 - 5 kann folgendes entnommen werden:
Sowohl bei 10°C als auch bei 37°C erfolgte eine rasche Adsorption der Viren an die Thrombocyten, wobei allerdings die Adsorptionsrate bei 10°C größer war.
Im Gegensatz zu den in Tabelle 1 und 3 aufgeführten Experimenten eluierten enzymatisch inaktivierte Viren des Stammes B Lee nicht von den Thrombocyten. Dies war insofern zu erwarten, als in diesem Versuch ein für die Elution ungünstiges Verhältnis von Viren zu Thrombocyten bestand. (Vergleiche hierzu die Ergebnisse in Tabelle 3: an eine große Thrombocytenmenge wurden zwar mehr Viruspartikel adsorbiert, jedoch weniger Viren wieder von der Plättchenoberfläche eluiert).
Die enzymatisch aktiven Viren des Stammes B Lee eluierten erst bei 37°C.
Die Viren des A_2-Stammes eluierten von der Thrombocytenoberfläche auch bei 10°C. Diese Elution verlief zwar langsamer als diejenige bei 37°C, erreichte jedoch bereits nach 2 Stunden den 37°-Wert. Die vergleichenden Untersuchungen unter Verwendung von Erythrocyten zeigten, daß es bei 10°C im beobachteten Zeitraum zu keiner Ablösung

von nachweisbaren Virushämagglutininen kam.

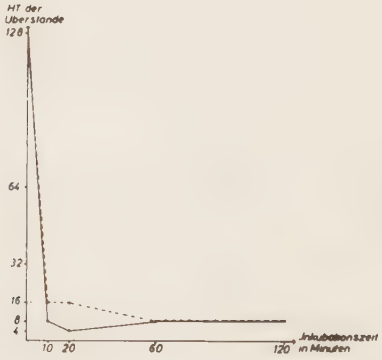
Abbildung 2: Der Einfluß der Temperatur und Inkubationszeit auf die Adsorption von Influenzaviren an Thrombocyten.
(Versuch 1)



Erläuterung: VA (Stamm: B Lee; HT= 256) wurde mit gleichen Volumina einer Thrombocytensuspension (1,3 x 10^6 Thrombocyten/cmm) bei 10^oC bzw. 37^oC inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde der Virushämagglutiningehalt der Ueberstände bestimmt.
——— Inkubation bei 37^oC, - - Inkubation bei 10^oC.

Abbildung 3: Der Einfluß der Temperatur und Inkubationszeit auf die Adsorption von Influenzaviren an Thrombocyten.

(Versuch 2)

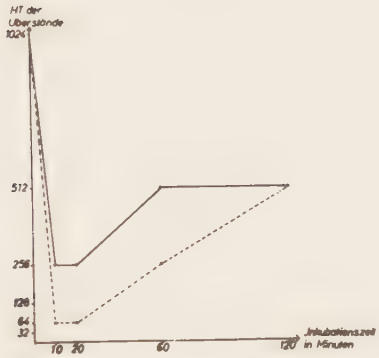


Erläuterung: siehe Abbildung 2.

In diesem Versuch wurde jedoch erhitzte VA (Stamm B Lee; HT=256) verwendet.

Abbildung 4: Der Einfluß der Temperatur und Inkubationszeit auf die Adsorption von Influenzaviren an Thrombocyten.

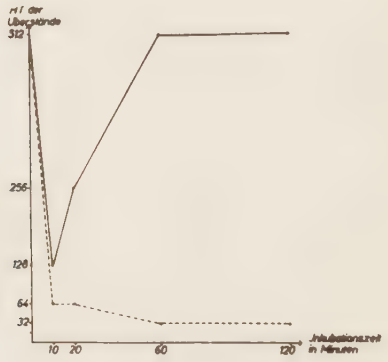
(Versuch 3)



Erläuterung: VA (Stamm: A_2/Sing/1/57; HT=2048) wurden mit gleichen Volumina des Thrombocytenansatzes (0,9 x 10^9 Thrombocyten/cmm) bei 10°C bzw. 37°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde jeweils der Virushämagglutiningehalt der Ueberstände bestimmt.

——— Inkubation bei 37°C,
- - - Inkubation bei 10°C.

Abbildung 5: Der Einfluß der Temperatur und Inkubationszeit auf die Adsorption von Influenzaviren an Hühnererythrocyten.



Erläuterung: Zu VA (Stamm: A_2/Sing/1/57; HT=1024) wurden gleiche Volumina einer Hühnererythrocytensuspension gegeben und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 10°C bzw.37°C die HT der Ueberstände bestimmt.

———— Inkubation bei 37°C,

- - - - Inkubation bei 10°C.

b) Die Anlagerung von Influenzaviren an vorbehandelte Thrombocyten (die Frage nach dem virusgerichteten Rezeptor der Thrombocyten).

Im folgenden soll versucht werden, das Virus-Adsorptions-Elutionsgeschehen bei Thrombocyten auf virusgerichtete Rezeptoren zurückzuführen. Jerushalmy u.Mitarb. (40) nehmen an, daß Thrombocyten solche Rezeptoren besitzen, und daß diese den virusgerichteten Rezeptoren der Erythrocytenoberfläche entsprechen. Die Autoren begründen diese Annahme damit, daß sie bei Adsorptionsversuchen von Myxoviren unter Verwendung von Thrombocyten annähernd die gleichen Adsorptionsraten und gleiche Adsorptionskinetik fanden wie unter Verwendung von Erythrocyten. Ferner wiesen sie eine Reduktion der elektrophoretischen Beweglichkeit beider Zellarten nach Einwirkung von RDE nach. Außerdem konnte in Thrombocyten Neuraminsäure nachgewiesen werden (5, 51, 81). Darüber hinaus zeigten Madoff und Mitarb.(51), daß sowohl Influenzaviren als auch RDE Neuraminsäure aus Thrombocyten freizusetzen vermögen. Auch diese Befunde deuten darauf hin, daß die Thrombocyten ähnliche virusgerichtete Rezeptoren besitzen wie die Erythrocyten.

Die Anlagerung von Viren an RDE-vorbehandelte Thrombocyten: Eine Thrombocytensuspension wurde mit gleichem Volumen einer RDE-Verdünnung von 1:25 versetzt und 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch höhere RDE-Konzentrationen werden die Zellen aggregiert, so daß bereits durch Verkleinerung der Oberfläche eine Adsorptionsverminderung hervorgerufen wird. Das RDE wurde danach ausgewaschen und zu den resuspendierten Thrombocyten ein gleiches Volumen VA (Virusstamm: A2/Sing/1/57) gegeben. Die Viren konnten nach 30minütiger Adsorption quantitativ im Ueberstand nachgewiesen werden. Hieraus schließen wir, daß nach RDE-Behandlung der Thrombocyten keine Adsorption mehr erfolgte.

Anlagerung von Viren an virusvorbehandelte Thrombocyten: Die Ergebnisse eines Versuches, Influenzaviren an influenzavirusvorbehandelte Thrombocyten anzulagern, sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Anlagerung von Viren an virusvorbehandelte Thrombocyten.

Virusadsorption an					
native Thrombocyten				virusvorbehandelte Thrombocyten	
HT der Virus-Thrombocyten-Mischung (errechnet)	HT der Ueberstände nach Adsorption (50'- 4°C)	HT der Ueberstände nach Elution (2 h - 37°C)	HT der Ueberstände nach Waschen des Sedimentes (in 5 ml Puffer	HT der Virus-Thrombocyten-Mischung (errechnet)	HT der Ueberstände nach Adsorption (30'- 4°C)
1024	256	256	-	512	512
256	32	64	-	512	128

Erläuterung: Thrombocytenzahl: $1{,}3 \times 10^9$/cmm. Viruspartikel der VA (Stamm B Lee) wurden an Thrombocyten adsorbiert und nach 50 min in der Wärme wieder eluiert. Die so vorbehandelten Thrombocyten wurden erneut mit VA gemischt. Nach jedem Arbeitsgang bestimmten wir den HT der Ueberstände.

In diesem Versuch konnten wir zeigen, daß nach Vorbehandlung der Thrombocyten mit ausreichend großen Virusmengen kein weiteres Virusmaterial mehr adsorbiert wurde. Wir schließen daraus, daß virusgerichtete Rezeptoren der Thrombocyten durch die Vorbehandlung weitgehend abgebaut wurden. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, daß trotz stattgefundener Viruselution (256 hämagglutinierende Einheiten) die Zellen kein neues Virusmaterial anlagerten.

Anlagerung von Viren an ultrabeschallte Thrombocyten:
Da sich gezeigt hatte (Tabelle 6), daß an die durch Ultraschall zerstörten virusbeladenen Thrombocyten zunächst noch ein großer Teil der adsorbierten Viren gebunden blieb, wurden Versuche unternommen, Influenzaviren an ultrabeschallte Thrombocyten zu adsorbieren bzw. diese Adsorption durch RDE-Behandlung der Zelltrümmer zu hemmen. Hierzu wurden gleiche Teile einer Thrombocytensuspension vor, bzw. nach 10minütigem Beschallen mit RDE (Endkonzentration 1:20) 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine gleiche ultrabeschallte Thrombocytenmenge ohne RDE-Zusatz inkubiert. Nach 12 Stunden wurden die 3 Proben 60 min lang auf 56°C erhitzt, um das RDE zu inaktivieren. Danach wurden jeweils gleiche Volumina VA (Stamm:A_2/Sing/1/57) zugegeben. Nach 20minütiger Adsorption bei 4°C wurden die Zelltrümmer 10 min lang in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert und vom Ueberstand der HT bestimmt.
Die Ergebnisse siehe in Tabelle 8.

Tabelle 8: Anlagerung von Influenzaviren an ultrabeschallte Thrombocyten.
(Versuche mit und ohne RDE-Vorbehandlung).

Behandlung der Thrombocyten-zelltrümmer	HT nach Zusatz der beschallten Thrombocytensuspension (errechnet)	HT nach der Adsorption
mit RDE: vor der Beschallung	128	-
nach der Beschallung	128	4
ohne RDE (Kontrolle)	128	-

Erläuterung: Gleiche Teile eines Thrombocytenansatzes wurden vor, bzw. nach Ultraschallbehandlung mit RDE inkubiert. Eine gleiche

Menge des Thrombocytenansatzes wurde lediglich ultrabeschallt. Die so vorbehandelten Thrombocytenzelltrümmer wurden mit Influenzaviren (Stamm: A_2/Sing/1/57) inkubiert und danach der HT der Ueberstände bestimmt. (Näheres s.Text).

Es zeigte sich, daß ultrabeschallte Thrombocyten Viren nach wie vor gut zu binden vermögen, und daß diese Adsorptionsfähigkeit durch RDE unbeeinflußt bleibt.

Anlagerung von Viren an trypsin- und perjodatvorbehandelte Thrombocyten:
(Versuche an intakten und ultrabeschallten Thrombocyten).

Je 0,5 ml einer Suspension intakter und durch Ultraschall zerstörter Thrombocyten wurden mit 2 mg Trypsin 15 Stunden bei 37°C inkubiert, desgleichen die entsprechenden Kontrollansätze ohne Trypsin. Nach einstündigem Erhitzen der 4 Proben auf 56°C wurden jeweils gleiche Volumina einer VA (Stamm A_2/Sing/1/57) zugegeben und 10 min bei 4°C zur Adsorption stehen gelassen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 18.000 g wurde vom Ueberstand der Hämagglutiningehalt bestimmt. Suspensionen intakter und ultrabeschallter Thrombocyten wurden 15 Stunden bei 4°C mit m/100 $NaJO_4$ inkubiert, desgleichen die entsprechenden Kontrollansätze ohne Perjodat. Die 4 Proben wurden danach mit gleichen Volumina 1%igem Aethylenglycol versetzt und 60 min auf 56°C erhitzt. Zu je 0,5 ml der Proben wurden gleiche Volumina VA (A_2/Sing/1/57) gegeben und 10 min bei 4°C zur Adsorption stehen gelassen. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei 18.000 g) wurde der Hämagglutiningehalt der Ueberstände bestimmt.
Ergebnisse s.Tabelle 9.

Tabelle 9: Anlagerung von Viren an trypsin- und perjodat-vorbehandelte Thrombocyten.
(Versuche mit intakten und ultrabeschallten Thrombocyten).

Thrombocytenpräparation	HT der Ueberstände nach erfolgter Adsorption
Intakte Thrombocyten, trypsiniert	512
Intakte Thrombocyten, unbehandelt	128
Ultrabeschallte Thrombocyten trypsiniert	512
unbehandelt	16
Intakte Thrombocyten, perjodat-behandelt	1024
unbehandelt	128
Ultrabeschallte Thrombocyten perjodatbehandelt	1024
unbehandelt	64

Erläuterung: Gleiche Volumina einer Suspension intakter sowie ultrabeschallter Thrombocyten wurden mit Trypsin bzw. Perjodat vorbehandelt. Präparationen intakter sowie ultra beschallter Thrombocyten wurden ohne diese Zusätze als Kontrollen jeweils mitgeführt. Alle Ansätze wurden mit VA (Stamm: A_2/Sing/1/57) inkubiert (errechneter HT der Mischung jeweils 2048) und die Ueberstände auf ihren Virushämagglutiningehalt geprüft. (Näheres s.Text).

Es zeigte sich, daß die ultrabeschallten Thrombocyten im Vergleich zu den intakten Zellen weit mehr Virusmaterial adsorbieren können. Ein Vergleich mit Hühnererythrocyten machte deutlich, daß die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten nach Ultraschallbehandlung weitgehend aufgehoben war. (Entsprechende Ergebnisse an mechanisch zerstörten Erythrocyten siehe bei Hirst [39]).

Durch die Trypsinbehandlung wurde die Fähigkeit der intakten und ultrabeschallten Thrombocyten, Viren zu binden, reduziert. Die Adsorptionskapazität der ultrabeschallten Thrombocyten wurde durch Trypsin weit mehr beeinträchtigt als diejenige der intakten Thrombocyten. Auch durch Perjodat wurde die Adsorptionsfähigkeit der intakten und der durch Ultraschall zerstörten Blutplättchen weitgehend herabgesetzt.

C D I S K U S S I O N

1.) Zum Phänomen der Aggregation von Thrombocyten durch Influenzaviren in vitro.

Es konnte von uns - in Uebereinstimmung mit Kotulsky (59) und Lu (50) - gezeigt werden, daß sich Influenzaviren (Typen A_2 und B) in vitro an verschiedenartige Thrombocyten anlagern und diese zur Aggregation veranlassen. Die virusbedingte Verklumpung der Thrombocyten war sowohl makroskopisch (Röhrchen- und Objektträgertest) als auch mikroskopisch gut erkennbar (vgl. mikroskopische Aufnahmen auf Seite 12). Die Thrombocytenaggregate blieben in der Beobachtungszeit (etwa 12 Stunden) morphologisch weitgehend unverändert, sodaß wir den Eindruck hatten, daß sich eine virusbedingte Thrombocytolyse nicht anschloß. Auch Jerushalmy und Mitarb. (38) konnten durch Einwirkung von Influenzaviren auf Thrombocyten diese nicht zur Lyse bringen. Allerdings gelang ihnen eine Thrombocytolyse durch einen anderen Vertreter der Myxovirusgruppe, das Newcastle Disease Virus. Ihren Untersuchungen zufolge wurde durch dieses Virus ein Gerinnungsfaktor aus Thrombocyten

freigesetzt, der zur Bildung von Thrombokinase Anlaß gab und eine Beschleunigung der Gerinnungszeit bewirkte (41). Mit Influenzaviren konnten die Autoren die Gerinnungszeit nur geringfügig beeinflussen.

In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage nach einer möglichen Beteiligung von intravasalen Viren an einer Thromboseentstehung. Es wäre denkbar, daß es z.B. beim Ablauf einer zyklischen Virusinfektion im Stadium der Virämie zu einer virusbedingten Plättchenaggregation und einer Beeinflussung der Blutgerinnung mit Thrombosefolge kommt. Allerdings sind die Stadien der Virämie meist kurz und die kreisenden Virusmengen nicht sehr hoch.

2.) Zu den Virusadsorptions- und -elutionsstudien an Schafthrombocyten.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich hauptsächlich mit diesen Untersuchungen. Thrombocyten vom Schaf vermögen unseren Untersuchungen zufolge Influenzaviren der Stämme A_2/Sing/1/57 und B Lee zu adsorbieren. Der Prozentsatz der adsorbierten Viren war abhängig von dem Verhältnis von Viren zu Thrombocyten. In vergleichenden Untersuchungen, bei denen wir die Thrombocyten durch Hühnererythrocyten ersetzten, ergaben sich - in Uebereinstimmung mit den Befunden von Jerusalmy und Mitarb. (40) - im Hinblick auf die Virusadsorptionsrate, Virusadsorptionsgeschwindigkeit und die Temperaturabhängigkeit der Virusanlagerung keine wesentlichen Unterschiede. Ginsberg und Blackmon (24) beschrieben ein ähnliches Verhalten der Virusadsorption an Leukocyten.
Unsere Elutionsstudien ergaben, daß sich Influenzaviren von Schafthrombocyten nur langsam und unvollständig eluieren lassen. In Uebereinstimmung mit den Untersuchungen von Jerushalmy u.Mitarb. (40) an menschlichen Thrombocyten fanden wir weniger als 40% der adsorbierten Viren im Eluat.

Im Gegensatz zu diesen Befunden an Thrombocyten hatte Hirst (29) bereits 1942 gezeigt, daß enzymaktive Influenzaviren von Hühnererythrocyten praktisch quantitativ eluiert werden können. Diese Unterschiede im Elutionsgeschehen könnten darauf beruhen, daß bei der Virusadsorption an Thrombocyten der größte Teil des Virusmaterials irreversibel an spezifische Rezeptoren gebunden wird oder aber in das Zellinnere eindringt. Von dort dürften die Viruspartikel nicht mehr ohne weiteres eluierbar sein. Für letztere Erklärung sprechen der elektronenoptische Nachweis von Myxoviren innerhalb der Thrombocyten (15) sowie die vollständige Eluierbarkeit der Viren nach Aufschluß der Zellen durch Ultraschall (eigene Untersuchungen).

Ginsberg und Blackmon (24) fanden bei Virusadsorptions- und -elutionsstudien unter Verwendung von Meerschweinchenleukocyten ebenfalls eine unvollständige und langsame Elution. Es ergeben sich somit Aehnlichkeiten im Viruselutionsgeschehen an Thrombocyten und Leukocyten. Influenzaviren vermögen auch in weiße Blutkörperchen einzudringen (6, 16, 35). Es ist daher zu vermuten, daß die unvollständige Viruselution an beiden genannten Zellarten auf der gleichen Ursache beruht, nämlich der Inkorporation eines Teiles der adsorbierten Viruspartikel in das Zellinnere.

Um die Frage nach der Existenz eines virusspezifischen Rezeptors zu klären, wurden von uns Eingriffe sowohl an den Thrombocyten als auch an den Influenzaviren vorgenommen. Zunächst wurden die Viren in enzymaktivem und enzyminaktivem Zustand (Stamm B Lee) mit Thrombocyten inkubiert. Dabei ergab sich der auffällige Befund, daß auch hitzeinaktivierte Influenzaviren (vom Stamm B Lee) noch in der Lage waren, sich in größeren Quantitäten von der Thrombocytenoberfläche zu lösen. Diese Tatsache ist

schwer vereinbar mit der Rezeptortheorie, wie sie für Erythrocyten aufgestellt wurde. Man muß aber einräumen, daß es auch experimentelle Anhaltspunkte für die Möglichkeit einer nicht-enzymatischen Elution der Myxoviren von Erythrocyten gibt (3, 13, 71, 78, 79). In diesen Arbeiten wird darauf hingewiesen, daß es Fälle einer geringen Bindungsaffinität (Avidität) zwischen Viren und Erythrocyten gibt (78) sowie Beispiele, bei denen bereits eine starke Reduktion der Ionenkonzentration zu einer spontanen Elution ohne Rezeptorbeteiligung führte (3).
Wieweit für die Elution des A_2-Stammes von Thrombocyten eine Enzymaktivität notwendig ist, läßt sich aus unseren Versuchen nicht sicher entscheiden. Bei dem von uns verwendeten Stamm (A_2/Sing/1/57) wird die Enzymaktivität erst bei ca.70°C zerstört (72). Bei dieser Temperatur gehen aber bereits die hämagglutinierenden Eigenschaften der Viren verloren, sodaß sich dieser Stamm nicht als Indikatorvirus verwenden läßt. Die relativ rasche Elution dieses A_2-Stammes von Thrombocyten bei 10°C ist nicht sicher zu deuten. Vergleichende Untersuchungen unter Verwendung von Erythrocyten ließen im beobachteten Zeitraum bei dieser Temperatur keine Elution erkennen. Eine nichtenzymatisch bedingte Dissoziation der A_2-Viren von den Thrombocyten ist jedoch aus dem Verlauf der Adsorptionskurve (Abbildung 4) auszuschließen. Bei einer reinen physikalischen Adsorption und Elution müßte sich ein Gleichgewicht zwischen adsorbierten und freien Viren einstellen, das sich nicht mehr verändert, solange die Temperatur konstant bleibt.

In weiteren Versuchen, die das Ziel verfolgten, die Frage nach dem virusgerichteten Rezeptor an Thrombocyten abzuklären, wurden die intakten und ultrabeschallten Blutplättchen mit enzymaktiven Influenzaviren, RDE, Trypsin und Perjodat vorbehandelt. Aus den Ergebnissen ziehen wir

folgende Schlüsse:

1.) Influenzavirus- sowie RDE-vorbehandelte Thrombocyten waren nicht mehr imstande, Influenzaviren zu binden.

2.) Trypsin- sowie perjodatvorbehandelte Thrombocyten vermochten, im Gegensatz zu nativen Blutplättchen, nur noch eine geringe Virusmenge zu adsorbieren.

3.) Nach Einwirkung von Ultraschall (10 Minuten bei 25 kHz) war das Vermögen der Thrombocyten, Virushämagglutinin zu binden, größer.

4.) Das Thrombocytenmaterial, das durch Ultraschallbehandlung freigesetzt wurde, erwies sich als weitgehend RDE-resistent, dagegen trypsin- und perjodatempfindlich. Die experimentellen Befunde zeigten, daß RDE-behandelte ultrabeschallte Thrombocyten praktisch unverändert Virushämagglutinin zu binden vermochten, während perjodat- und trypsinbehandelte ultrabeschallte Thrombocyten nur noch geringe Virusmengen anlagerten. Eine Beeinflussung der Indikatorerythrocyten beim Virushämagglutininnachweis kann insofern ausgeschlossen werden, als sich diese Substanzen auch in den Präparaten intakter Thrombocyten befanden.

Viele der genannten Untersuchungsbefunde werfen die Frage nach einem virusgerichteten Rezeptor an der Oberfläche und im Inneren von Thrombocyten auf. Eine mögliche Arbeitshypothese, die in Uebereinstimmung mit unseren experimentellen Befunden steht, soll im folgenden aufgeführt werden:
Thrombocyten besitzen an ihrer Oberfläche RDE-empfindliche virusgerichtete Strukturen ("perimembranöse Rezeptoren"), an die sich enzymaktives und enzyminaktives Virusmaterial anlagern kann. Diese "Rezeptoren", die zudem trypsin- und perjodatempfindlich sind, könnten mit den

virusgerichteten Rezeptoren der roten Blutkörper chen identisch sein. Es handelt sich bei diesen Rezeptoren um ein Mukoproteid (30) mit endständiger N-acetyl-Neuraminsäure. Auch menschliche und tierische Thrombocyten enthalten große Mengen Neuraminsäure (5, 51, 81). Madoff u.Mitarb. (51) zeigten, daß aus menschlichen Thrombocyten sowohl durch RDE als auch durch Influenzaviren Neuraminsäure freigesetzt wird. Diese Befunde bestärken die Annahme virusgerichteter Rezeptoren an Thrombocyten, die denjenigen an Erythrocyten im chemischen Aufbau verwandt sein dürften.

Nach Ultraschallbehandlung der Thrombocyten werden Zellstrukturen freigesetzt, die gleichfalls Virushämagglutinin zu binden vermögen. Unseren Untersuchungen zufolge kann es sich nicht um die an der Oberfläche verankerten RDE-empfindlichen Rezeptoren handeln, da sie ein anderes Verhalten gegenüber RDE zeigen. Aus diesem Grunde postulieren wir virusgerichtete Zellstrukturen ("innere Rezeptoren"), die von den genannten perimembranösen zu unterscheiden wären. Es ist denkbar, daß die zunächst an die äusseren Rezeptoren angelagerten Viruspartikel aktiv in die Thrombocyten eindringen und dort an den beschriebenen Rezeptoren verankert werden. Ueber das weitere Schicksal (Ueberleben, Abbau, Vermehrung) kann nichts Sicheres ausgesagt werden. Die Vermutung, daß es einen inneren RDE-unempfindlichen Rezeptor für Influenzaviren in Thrombocyten gibt, kann durch zwei unserer Befunde bestärkt werden: einmal dadurch, daß nach Ultraschallbehandlung virusbeladener Thrombocyten der größte Teil der Viren zunächst noch an die Zelltrümmer gebunden bleibt und erst nach 2stündiger Inkubation eluiert wird; zum andern eluiert auch enzyminaktives Virusmaterial quantitativ von diesen Zelltrümmern.

Der Beweis für das Vorliegen zweier unterschiedlicher virusgerichteter Rezeptoren an Schafthrombocyten bedarf weiterer biochemischer Untersuchungen über diese Strukturen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Wechselwirkung von Influenzaviren und Thrombocyten. Influenzaviren vom Stamm A_2/Sing/1/57 und B Lee vermögen Thrombocyten vom Mensch, Kaninchen und Schaf in vitro zu aggregieren.
Aus quantitativen Virusadsorptions- und -Elutionsstudien an unvorbehandelten sowie an RDE-, trypsin-, perjodat-, virus- und ultraschallvorbehandelten Schafthombocyten wurde die Existenz eines an der Oberfläche der Blutplättchen befindlichen virusgerichteten Rezeptors bestätigt und ein virusbindender Rezeptor innerhalb der Thrombocyten wahrscheinlich gemacht.

E LITERATURNACHWEIS

1. Adelson, E., J.J.Rheingold and W.H.Crosby:
The platelet as a sponge: A review.
Blood 17, 767 (1961).

2. Aynaud, M.: Action des microbes sur les globulins.
Compt. rend. soc. biol. 70, 54 (1911).

3. Barua, D. et B.Fauconnier: Élution non enzymatique
du virus grippal.
Ann.Inst.Pasteur 97, 479 (1959).

4. Berg, R.B. and M.S.Rosenthal: Propagation of measles
virus in suspensions of human and monkey leukocytes.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 106, 581 (1961).

5. Bezkorovainy, A. and D.G.Doherty:
Properties of structural proteins of bovine platelets.
Arch.Biochem. 86, 412 (1962).

6. Boand, A.V., J.E.Kempf and R.J.Hanson:
Phagocytosis of influenza virus. I. In vitro observations.
J.Immunol. 79, 416 (1957).

7. Böhm, P.: Die Neuraminsäure.
Dtsch.Ztschr. f. Verdauungs- u.Stoffwechselkrankheiten
19, 65 (1959).

8. Born, G.V.R., G.I.C.Ingram and R.S.Stacey:
The proportionality between the amounts of 5-hydroxy-
tryptamine and adenosine triphophate in blood platelets.
J.Physiol. 135, 63P (1956).

9. Born, G.V.R. and O.Hornykiewicz: The proportionality
between the uptake of adrenalin by blood platelets
and their content of adenosine triphosphate.
J.Physiol. 136, 30 P (1957).

10. Born, G.V.R. and R.E.Gillson:
The uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets.
J.Physiol. 137, 82 P (1957).

11. Bull, C.G. and C. Mc Kee: The relation of blood platelets to the in vivo agglutination of bacteria and their dissappearance from the blood stream.
Amer. J. Hyg. 2, 208 (1922).

12. Burnet, F.M., J.F. Mc Crea, and J.D.Stone:
Modification of human red cells by virus.
I. The receptor gradient for virus action in human red cells.
Brit. J. exp. Path. 27, 228 (1946).

13. Chu, C.M.: Agglutination of red blood cells of different animal species by influenza and Newcastle disease viruses.
J. Hyg. 46, 239 (1948).

14. Chu, C.M.: Enzymic action of viruses and bacterial products on human red cells.
Nature. 161, 606 (1948).

15. Danon, D., Z.Jerushalmy, and A.de Vries:
Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. Electron microscopical observation.
Virology 9, 719 (1959).

16. Danon, D., Z.Jerushalmy, A.Kohn, and A.de Vries:
In vitro phagocytosis by leucocytes of influenza virus adsorbed to erythrocytes.
Virology 15, 258 (1962).

17. Davis, R.B., W.R.Meeker, and D.G. Mc Quarrie:
Immediate effects of intravenous endotoxin on serotonin concentrations and blood platelets.
Circulation Res. 8, 234 (1960).

18. Davis, R.B., W.R.Meeker, and W.L.Bailey: Serotonin release after injection of E.coli endotoxin in the rabbit.
Fed.Proc. 20, 261 (1961).

19. Delrez, L. et P.Govaerts: L'intervention des globulins dans l'élimination des microbes injectés dans la circulation.
Compt. rend. soc. biol. 81, 53 (1918).

20. Fischer, K. und G.Landbeck: Ein Beitrag zur Thrombocytenisolierung für gerinnungsphysiologische und immunhämatologische Untersuchungen.
Klin.Wschr. 37, 562 (1959).

21. Fisher, T.N. and H.S.Ginsberg: The reaction of influenza viruses with guinea pig polymorphnuclear leucocytes. III. Studies on the mechanism by which influenza viruses inhibit phagocytosis.
Virology 2, 656 (1956).

22. Franklin, R.M.: The growth of fowl plague virus in tissue cultures of chicken macrophages and giant cells.
Virology 6, 81 (1958).

23. Gildemeister, E. und P.Hilgers: An welchen Blutbestandteilen haftet das nach kutaner Impfung des Kaninchens in den Blutkreislauf gelangende Vakzinevirus?
Zbl. f. Bakt. I.Orig. 127, 258 (1930).

24. Ginsberg, H.S. and J.R.Blackmon: Reactions of influenza viruses with guinea pig polymorphnuclear leucocytes. I. Virus-cell interactions.
Virology 2, 618 (1956).

25. Govaerts, P.: La fonction antixénique des plaquettes sanguines.
Arch. intern. physiol. 16,1 (1921).

26. Gresser, I. and C.Chany: Multiplication of poliovirus typ I in preparations of human leucocytes and its inhibition by interferon.
J. Immunol. 92, 889 (1964).

27. Hanson, R.J., J.E.Kempf, and A.V.Boand: Phagocytosis of influenza virus. II. Its occurence in normal and immune mice.
J. Immunol. 79, 422 (1957).

28. Hirst, G.K.: The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus.
Science 94, 22 (1941).

29. Hirst, G.K.: Adsorption of influenza hemagglutinins and virus by red blood cells.
J. exp. Med. 76, 195 (1942).

30. Hirst, G.K.: The nature of the virus receptors of red cells. I. Evidence on the chemical nature of the virus receptors of red cells and of the existence of a closely analogues substance in normal serum.
J. exp. Med. 87, 301 (1948).

31. Horowitz, H.J., R.M. des Prez, and E.W.Hook: Effects of bacterial endotoxin on rabbit platelets. II. Enhancement of platelet factor 3 activity in vitro and in vivo.
J. exp. Med. 116, 619 (1962).

32. Houlihan, R.B.: Studies on the adhesion of human blood platelets and bacteria.
Blood 1, special issue, 142 (1947).

33. Houlihan, R.B.: The adhesion of dog platelets to bacteria.
Blood 1, special issue, 155 (1947).

34. Houlihan, R.B. and A.L.Copley: The adhesion of rabbit platelets to bacteria.
J.Bact. 52, 439 (1946).

35. Inglot, A. and F.M.Davenport: Studies on the role of leukocytes in infection with influenza virus. J. Immunol. 88, 55 (1962).

36. Izak, G., D.Nelken, and J.Gurevitch: Studies on thrombopoiesis. I. Thrombocytopoiesis in Vitro: Experiments with animal and normal human material. Blood 12, 507 (1957).

37. Jamuni, A. and M.Holden: The role of leucocytes in immunity to herpes. J. Immunol. 26, 395 (1934).

38. Jerushalmy, Z.: The action of myxoviruses on human blood platelets. Thesis 1960 (for Ph.D.degree), Hebrew University, Jerusalem.

39. Jerushalmy, Z., D.Danon, A.Kohn, and A.de Vries: Mixed agglutination of human platelets and red cells by influenza virus in vitro. Phase-contrast and electron-microscopical observations. Vox sang. 4, 292 (1959).

40. Jerushalmy, Z., A.Kohn, and A.de Vries: Interaction of myxoviruses with human blood platelets in vitro. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 106, 462 (1961).

41. Jerushalmy, Z., A.Adler, J.Rechnic, A.Kohn, and A.de Vries: Effect of myxoviruses on the clotting and clot retraction activities of human blood platelets in vitro. Path. Biol. 10, 41 (1962).

42. Jókay, I., L.Kassay, and A.Kiss: Inhibition of endotoxin-induced platelet agglutination, histamine and serotonine release in vitro by thiol-compounds. Experientia 20, 315 (1964).

43. Kańtoch, M., A.Skurski, and Z.Wieczorek: In vitro blockade of bacterial phagocytosis of leucocytes by means of bacterial viruses.
Schweiz. Z. Path. Bakt. 21, 1106 (1958).

44. Kańtoch, M., und K.Zapf: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Lokalisation von Coxsackie-Viren in Leukocyten.
Acta Biol. med. Germanica 3, 351 (1959).

45. Köhler, H.: Die Rolle der Leukocyten als Virusträger.
Zbl. f. Bakt. I Orig. 180, 140 (1960).

46. Köhler, H.: Neue Wege bei der Isolierung des Poliomyelitisvirus aus dem Blut an Kinderlähmung erkrankter Menschen.
Zbl. f. Bakt. I Orig. 180, 145 (1960).

47. Köhler, H. und D.Springer: Isolierung von phagocytiertem Virus aus Leukocyten infizierter Tiere.
Zbl. f. Bakt. I Orig. 186, 287 (1962).

48. Kovács,E., R.K.Baratawidjaja, A.Walmsley-Newson, and N.A.Labzoffsky: Demonstration of poliovirus in isolated leucocytes, blood and CSF smears of infected monkey by immunofluorescence and biological means.
Arch. ges. Virusforsch. 14, 143 (1963).

49. Liu, C. and D.L.Coffin: Studies on canine distemper infection by means of fluorescein-labeled antibody. I. The pathogenesis, pathology and diagnosis of the disease in experimentally infected ferrets.
Virology 3, 115 (1957).

50. Lu, W.C.: Agglutination of human platelets by influenza (PR 8 strain) virus and mumps virus.
Fed. Proc. 17, 446 (1958).

51. Madoff, M.A., S.Ebbe, and M.Baldini: Sialic acid of human blood platelets.
J. clin. Invest. 43, 870 (1964).

52. Mannweiler, K. und O.Palacios: Ultrastrukturelle Veränderungen am ZNS von Rhesusaffen nach Infektion mit Poliomyelitis-Virus.
Ztschr. Naturfrschg. 16, 705 (1961).

53. Mc Clelland, L. and R.Hare: The adsorption of influenza virus by red cells and a new in-vitro method of measuring antibodies for influenza virus.
Canad. J. publ. Health 32, 530 (1941).

54. Mc Crea,J.F.: Modification of red cell agglutinability by Cl.Welchii toxins.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 25, 127 (1947).

56. Mc Kay, D.G. and S.S.Shapiro: Alterations in the blood coagulation system induced by bacterial endotoxin. I. In vivo (generalized Shwartzman reaction).
J. exp. Med. 107, 353 (1958).

57. Merchant, D.J. and H.R.Morgan: Inhibition of the phagocytic action of leucocytes by mumps and influenza viruses.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 651 (1950).

58. Merling, K.B.E.: Phagocytosis of vaccinia virus in vitro.
J. Path. Bact. 57, 21 (1945).

59. Motulsky, A.G.: Platelet agglutination by influenza virus.
Clin. Res. Proc. 1, 100 (1953).

60. Nelson, E., H.Hager, and E.Kovács: Virus-containing leukocytes in polioencephalitis.
Science 139, 499 (1963).

61. Mungester, W.J., J.D.Gordon, and K.E.Collins: Comparison of the erythrocyte and leucocyte cell surfaces of guinea pigs by use of agglutination techniques. J. Infect. Dis. 87, 71 (1950).

62. Parikh, G., I.L.Shechmeister, and R.S.Yen: Phagocytosis and multiplication of meningopneumonitis virus (MPV) in white blood cells in vitro and in vivo. Bact. Proc. 160 (1963).

63. Pickels, M.M.: Effect of cholera filtrate on red cells as demonstrated by incomplete Rh antibodies. Nature 158, 880 (1946).

64. Prez, R.M.des: Effects of bacterial endotoxin on rabbit platelets. III. Comparison of platelet injury induced by thrombin and by endotoxin. J. exp. Med. 120, 305 (1964).

65. Prez, R.M.des, H.J.Horowitz, and E.W.Hook: Effects of bacterial endotoxin on rabbit platelets. I. Platelet aggregation and release of platelet factors in vitro. J. exp. Med. 114, 857 (1961).

66. Reed, R.L. and H.Muench: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer. J. Hyg. 27, 493 (1938).

67. Roskam, J.: La fonction antixénique des globulins. Compt. rend. soc. biol. 85, 269 (1921).

68. Roskam, J.: Contribution à l'étude de la physiologie normale et pathologique du globulin (plaquette de Bizzozero). Arch. int. Physiol. 41, 241 (1922-23).

69. Salk, J.E.: A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. J. Immunol. 49, 87 (1944).

70. Salvidio, E. and W.H.Crosby: Thrombocytopenia after intravenous injection of india ink.
J. Lab. clin. Med. 56, 711 (1960).

71. Schmidt, B. und K.Grossgebauer: Myxovirus-Hämagglutinationsversuche mit unterschiedlichen Erythrocytenarten.
Ztschr. Hyg. 146, 26 (1959).

72. Schmidt, B., K.Grossgebauer und D.Hartmann: Ueber die Enzymaktivität äthergespaltener Influenzaviren und ihren Einfluß auf unspezifische Seruminhibitoren.
Z. Immun.-Forsch. 120, 238 (1960).

73. Shimamoto, T., H.Yamazaki, K.Ohno, H.Uchida, T.Konishi and S.Iwahara: Effect of bacterial endotoxins on platelets and release of serotonin (5-hydroxytryptamine). 1. Bacterial endotoxin on the number of circulating platelets.
Proc. Japan.Acad. 34, 444 (1958).

74. Shimamoto, T., H.Yamazaki, N.Sagawa, S.Iwahara, T.Konishi and H.Maezawa: Effect of bacterial endotoxins on platelets and release of serotonin (5-hydroxytryptamine). II. Appearance of platelet-agglutinating substance and serotonin (5-hydroxytryptamine) in the plasma of rabbit by administration of bacterial endotoxin.
Proc. Japan. Acad. 43, 450 (1958).

75. Smith, W.: The distribution of virus and neutralizing antibodies in the blood and pathological exudates of rabbits infected with vaccinia.
Brit. J. exper.Path. 10, 93 (1929).

76. Stetson, C.A.: Studies on the Mechanism of the Shwartzman phenomenon. Certain factors involved in the production of the local hemorrhagic necrosis.
J. exp. Med. 93, 489 (1951).

77. Stone, J.D.: Comparison of the action of V.cholerae enzyme and of viruses on the red cell surface.
Aust. J. exp.Biol. med.Sci. 25, 137 (1947).

78. Tamm, I.: Influenza virus-erythrocyte interaction. I. Reversible reaction between Lee virus and cat erythrocytes.
J. Immunol. 73, 180 (1954).

79. Tamm, I.: Influenza virus-erythrocyte interaction. II. Effect of egg passage on the reaction between a recently recovered influenza A virus and sheep erythrocytes.
J. Immunol. 73, 190 (1954).

80. Weil-Malherbe, H. and A.D.Bore: Blood platelets as carriers of adrenaline and noradrenaline.
Nature 174, 557 (1954).

81. Woodside, E.E. and W.Kocholaty: Carbohydrates of human and bovine platelets.
Blood 16, 1173 (1960).

- - - - - - - - - - - -

Herrn Professor Dr.med.Bernhard Schmidt möchte ich an dieser Stelle für die Ueberlassung der Arbeit und für die freundliche Unterstützung meinen verbindlichsten Dank sagen.

In gleicher Weise bin ich Herrn Dr.med Klaus Grossgebauer und Herrn Dr.rer.nat.Dieter Hartmann für ihre wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Durchführung der Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f .

Am 9.2.1937 wurde ich, Marianne Scriba, als Tochter des Diplom-Landwirts Georg Albrecht Scriba zu Alsfeld (Oberhessen) geboren. Von 1943 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Darmstadt und Niedernhausen/Odenwald. Zu Ostern 1949 trat ich in das Realgymnasium Gr.-Bieberau/Odenwald ein. Ab 1951 besuchte ich die Viktoriaschule (Realgymnasium für Mädchen) in Darmstadt, ab 1952 die Ursulinenschule (Realgymnasium für Mädchen) in Darmstadt, an der ich im Februar 1957 die Reifeprüfung ablegte.
Im Sommersemester 1957 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Frankfurt/Main und bestand dort nach 5 Semestern im August 1959 die ärztliche Vorprüfung. Nach weiteren 7 Semestern an den Universitäten Wien und Frankfurt legte ich im Sommersemester 1963 mein Staatsexamen an der Universität Frankfurt ab.
Vom 15.9.1963 bis 15.5.1964 arbeitete ich als Medizinalassistentin im Paul-Gerhardt-Stift, Berlin 65, danach vom 1.6.1964 bis 31.3.1965 am Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin. Seit dem 1.4.1965 bin ich in der II.Medizinischen Klinik des Städt.Krankenhauses Moabit, Berlin 21 tätig.